



# Universidad Austral de Chile

---

Facultad de Ciencias  
Escuela de Ciencias

**PROFESOR PATROCINANTE**

Dr. EDUARDO VALENZUELA F.  
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA  
FACULTAD DE CIENCIAS

**PROFESOR CO-PATROCINANTE**

JUAN CARLOS PAREDES G.  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
FACULTAD DE CIENCIAS

“DETERMINACION DE METABOLITOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA  
DESDE BASIDIOCARPOS DE *Auricularia polytricha*”

Tesis de Grado presentada como  
parte de los requisitos para optar  
al **Grado de Licenciado en  
Ciencias Biológicas.**

TEXIA ANDREA REYES MORALES  
VALDIVIA-CHILE  
2006

## INDICE DE CONTENIDOS

	Pág
<b>1. RESUMEN</b> .....	1
SUMMARY.....	2
<b>2. INTRODUCCION</b> .....	3
Aspectos taxonómicos y distribución de <i>Auricularia polytricha</i> .....	4
Aspectos taxonómicos de <i>Auricularia polytricha</i> .....	4
Distribución y ecología de <i>Auricularia polytricha</i> .....	6
Técnicas de cultivo y sustratos utilizados para la producción de <i>Auricularia polytricha</i> .....	7
<i>Auricularia polytricha</i> como agente terapéutico .....	7
Metabolitos microbianos .....	8
Metabolitos secundarios producidos por hongos .....	9
Terpenoides o Isoprenoides .....	10
Metabolitos producidos por <i>Auricularia polytricha</i> .....	11
Hipótesis .....	13
Objetivos Específicos .....	13
<b>3. MATERIAL Y METODO</b> .....	14
<b>3.1 MATERIALES</b> .....	14
3.1.1 Material Biológico .....	14
3.1.2 Reactivos .....	14
3.1.3 Equipos .....	14
3.1.4 Otros .....	15
<b>3.2 METODOLOGIA</b> .....	16

3.2.1	Masificación de la cepa micelial de <i>Auricularia polytricha</i> en placas con agar extracto de malta al 2% (AEM) .....	16
3.2.2	Tratamiento del sustrato para la masificación de la cepa micelial de <i>Auricularia polytricha</i> .....	16
3.2.3	Inoculación y masificación del micelio de <i>Auricularia polytricha</i> en botellas con granos de trigo .....	17
3.3	Sustratos empleados en la producción de basidiocarpos de <i>Auricularia polytricha</i> .....	18
3.3.1	Obtención y tratamiento de astillas de Roble .....	18
3.3.2	Inoculación de las astillas de Roble con el micelio masificado de <i>Auricularia polytricha</i> (Técnica de las cajas) .....	18
3.3.3	Inducción de basidiocarpos de <i>Auricularia polytricha</i> en astillas de Roble.....	19
3.3.4	Obtención y tratamiento de mezcla FONTEC 98-1390 .....	20
3.3.5	Inoculación de la mezcla FONTEC 98-1390 con el micelio masificado de <i>Auricularia polytricha</i> (Técnica de las bolsas) .....	20
3.3.6	Inducción de basidiocarpos de <i>Auricularia polytricha</i> en mezcla FONTEC 98-1390.....	21
3.4	Cosecha .....	21
3.5	Rendimiento de basidiocarpos de <i>Auricularia polytricha</i> .....	21
3.6	Micelio de <i>Auricularia polytricha</i> cultivado en caldo malta al 2%.....	22
3.7	Determinación de la capacidad antimicrobiana de filtrados obtenidos de basidiocarpos y cultivo liquido de la cepa de <i>Auricularia polytricha</i> .....	22
3.8	Análisis químico cualitativo para identificar terpenoides .....	23
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	25

4.1	Masificación de la cepa micelial de <i>Auricularia polytricha</i> en placas con agar extracto de malta al 2%.....	25
4.2	Masificación de la cepa micelial de <i>Auricularia polytricha</i> en granos de trigo .....	25
4.3	Crecimiento de <i>Auricularia polytricha</i> en astillas de <i>Nothofagus</i> y mezcla FONTEC 98- 1390 .....	25
4.4	Desarrollo de los basidiocarpos en astillas de Roble y mezcla FONTEC 98-1390 .....	27
4.5	Determinación de la capacidad antimicrobiana de los filtrados obtenidos de basidiocarpos y del cultivo micelial de <i>Auricularia polytricha</i> .....	29
4.5.1	Método de las gotas.....	29
4.5.2	Método de los discos de papel filtro.....	31
4.6	Análisis químico cualitativo de extractos metanólicos de <i>Auricularia polytricha</i> para determinar terpenoides.....	32
4.7	Rendimiento de basidiocarpos de <i>Auricularia polytricha</i> en los sustratos ensayados.....	34
<b>5.</b>	<b>DISCUSION</b> .....	<b>37</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>46</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXO</b> .....	<b>52</b>
	Preparación de reveladores cromatográficos .....	53

## INDICE DE TABLAS

	Pág
1. Determinación antimicrobiana, sobre cepas patrones, de filtrados obtenidos desde basidiocarpos cultivados en astillas de Roble.....	29
2. Determinación antimicrobiana, sobre cepas patrones, de filtrados obtenidos desde basidiocarpos cultivados en mezcla FONTEC 98-1390 .....	30
3. Determinación antimicrobiana, sobre cepas patrones, de filtrado obtenido del cultivo de <i>Auricularia polytricha</i> en caldo malta al 2 % .....	30

## INDICE DE FIGURAS

1. Grado de colonización del micelio de <i>A. polytricha</i> en astillas de Roble (Técnica de las cajas).....	26
2. Grado de colonización del micelio de <i>A. polytricha</i> en mezcla FONTEC 98-1390 (Técnica de las bolsas) .....	26
3. Basidiocarpos obtenidos en astillas de Roble .....	27
4. Basidiocarpos obtenidos en mezcla FONTEC 98-1390 .....	28
5. Tapiz de <i>Bacillus subtilis</i> .....	31
6. Tapiz de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	31
7. Tapiz de <i>Escherichia coli</i> .....	32
8. Tapiz de <i>Candida albicans</i> .....	32
9. Placa cromatográfica revelada con ácido sulfúrico al 30 % .....	33
10. Relación entre el peso fresco de los basidiocarpos obtenidos en las astillas de Roble (□) y la mezcla FONTEC 98-1390 (○) en función del tamaño del píleo .....	34

11. Relación entre el peso seco de los basidiocarpos obtenidos en las astillas de Roble (□) y la mezcla FONTEC 98-1390 (○) en función del tamaño del píleo .....	35
12. Relación entre la biomasa final de los basidiocarpos obtenidos en las astillas de Roble (□) y la mezcla FONTEC 98-1390 (○) en función del tamaño del píleo .....	35

## 1. RESUMEN

La especie *Auricularia polytricha* es un hongo saprófito, comestible, altamente valorado en China y Sud-este de Asia, debido a que se le atribuyen ciertas propiedades nutritivas y medicinales.

Se estudió la producción de metabolitos antimicrobianos desde basidiocarpos de *A. polytricha*. Para producir los basidiocarpos se utilizó como sustrato astillas de *Nothofagus* (Roble) y una mezcla FONTEC 98-1390.

La determinación de la actividad antimicrobiana se basó en dos experimentos. El primero consistió en preparar dos macerados a partir de los basidiocarpos cosechados de cada sustrato con agua destilada estéril. Cada macerado fue filtrado y distintos volúmenes de estos se depositaron sobre placas previamente sembradas con *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. En el segundo experimento los filtrados fueron rotavaporizados, por separado y disueltos con metanol. A partir de los extractos metanólicos se prepararon soluciones con 2, 4 y 5 mg en 1 mL de agua destilada estéril. Discos de papel filtro estéril fueron embebidos con las distintas concentraciones y depositados sobre las placas antes mencionadas.

Se determinó que los basidiocarpos de *A. polytricha* cultivados en sustratos artificiales, no producen metabolitos antimicrobianos. Probablemente porque los sustratos presentan alguna sustancia que inhibe la síntesis de una enzima clave en la vía metabólica de dicho metabolito. Por otro lado, los sustratos ensayados para el cultivo de *A. polytricha*, en condiciones de laboratorio e invernadero, fueron óptimos en términos de producción.

## SUMMARY

The *Auricularia polytricha* species is a fungi saprophytic, edible, very valued in China and Southeast Asia, due to its nutritional and medical properties.

The production of metabolites antimicrobial from basidiocarps of *A. polytricha* were studied. To produce these basidiocarps, it was used as substratum chips of *Nothofagus* (Oak) and a mixture FONTEC 98-1390.

Determination of antimicrobial activity, it was based in two experiments. The first one consisted in prepare two soaks starting from basidiocarps from each substratum with sterile distilled water. Each soak was filtered and different volumes of these were placed on *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* seeded plates. In the second experiment, the filtered were concentrated under a reduced pressure in a rotatory evaporator, separated from each other and dissolved them using methanol. Starting from methanolic extracts, solutions with 2, 4 and 5mg in 1 mL of sterile distilled water were prepared. Sterile filter paper discs were soaked by different concentrations and placed on plates wrote before.

It was determined that basidiocarps of *A. polytricha* cultivated in artificials substratums didn't produced antimicrobial metabolities. Probably because the substratum has some substance that inhibited synthesis of an key-enzyme in the metabolic way to produce that metabolite. On the other hand, the ensayed substratums to cultivate *A. polytricha*, in laboratory and glasshouse conditions, are ideal to produce them.



## 2. INTRODUCCION

Desde la perspectiva económica, los hongos ofrecen múltiples utilidades, pues se usan como alimentos, en panificación, en procesos como producción de vino y de cerveza, en la maduración de quesos y en el control biológico de plagas agrícolas. Además, las sustancias producidas por su actividad biológica pueden ser de gran utilidad en medicina y en la bioindustria, principalmente en la producción de antibióticos y como agentes para estimular el desarrollo de plantas (hongos formadores de micorriza) (Torres & Ríos, 2005).

En la naturaleza es posible encontrar una gran variedad de hongos, los cuales se dividen en especies venenosas y comestibles, esta última se agrupa en dos categorías: lignícolas u hongos de pudrición blanca y micorrízicos. Los primeros crecen a expensas de la descomposición de substratos vegetales ricos en fibra, como tallos lignificados y maderas duras, en tanto que las micorrizas, crecen asociadas a las raíces de las plantas (France, 2002).

Hoy en día, los hongos comestibles son conocidos por su alto valor nutritivo y por poseer propiedades medicinales indiscutibles. Si bien es cierto que su contenido proteico no iguala a la carne, si alcanza niveles nutricionales que superan a legumbres, verduras y farináceos. Por su parte, el contenido vitamínico de estos hongos es mayor en comparación con la carne y cualquier vegetal principalmente en vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y D (Manríquez, 1991).

En lo que respecta al uso de estos hongos en la medicina, se han aislados de algunos de ellos diversos principios activos, tales como: polisacáridos, terpenoides, complejos de péptido-polisacáridos y proteínas, los cuales son utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades (Sheu et al, 2004). Entre los hongos que presentan algunos de estos principios activos se puede señalar, a: *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc; *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst; *Grifola frondosa* (Dicks) Gray; *Lentinula edodes* (Berck.) Pegler, *Pleurotus djamor*

(Rumph. ex Fr.) Boedijn, entre otros. Cuyo consumo es recomendado en los siguientes casos: para reducir los niveles de colesterol, en el tratamiento de la diabetes, caída del cabello, desordenes nerviosos, hipertensión, disfunción sexual, ulcera intestinal, bronquitis crónica, además como antiparasitario, antioxidantes, laxantes, antiinflamatorio, antitumorales (Brizuela et al, 1998; Mau et al, 2001).

De acuerdo a la International Society for Mushroom de Inglaterra, mundialmente se cultivan unas 30 especies de hongos comestibles, produciendo sobre dos millones de toneladas de hongos cada año. A esta cifra hay que agregarle sobre un millón de toneladas de hongos silvestres, lo que totaliza los 3 millones de toneladas que se consumen en el mundo (France, 2002).

### **Aspectos taxonómicos, distribución y ecología de *Auricularia polytricha***

#### **Aspectos taxonómicos de *Auricularia polytricha***

Taxonómicamente *A. polytricha* (Mont.) Sacc, es un hongo que pertenece al Reino Fungi; División Basidiomycota, Clase Heterobasidiomycetes, Orden Auriculariales; Familia Auriculareaceae; género *Auricularia* (Yan et al, 2004). Esta especie también es conocida con los siguientes sinónimos, tales como: *Auricularia auricula-judae* var. *polytricha* (Mont.) Rick; *Hirneola polytricha* (Mont.) Fr. y *Exidia polytricha* Mont; entre los nombres comunes destaca: Oreja gelatinosa, Oreja de judas, Oreja de palo, Red ear, Wood ear, Pepeiao, Chole, Mu-earch, Jew's ear (Sheu et al, 2004; Schenck & Dudley, 1999; Mau et al, 2001).

Las especies de hongos comestibles más conocidas del género *Auricularia* son: *A. fuscosuccinea* (Mont.) Henn y *A. auricula* (Hook. f.) Underw; *A. mesentérica* (Dicks.) Pers; *A. delicata* (Fr.) Henn y *A. polytricha* son especies poco cultivadas hasta ahora (García, 1998).

La división Basidiomycota a la cual pertenece *A. polytricha* se caracteriza porque sus especies presentan un talo micelial, formado por hifas tabicadas que comúnmente presentan fibulas (clamp connection) o un talo unicelular como es el caso de los hongos levaduriformes. La reproducción se puede llevar a cabo por dos vías, la asexual dada por la producción de esporas llamadas conidias y la sexual que se caracteriza por la producción de esporas exógenas denominadas basidiosporas. Estas a su vez se forman en una estructura denominada basidio, el cual forma parte del himenio, la capa fértil del hongo en conjunto con otras estructuras tales como los basidiolos y cistidios; ambas son estructuras estériles que participan en la maduración de las basidiosporas (Valenzuela, 2004).

La mayoría de los Basidiomycota que desarrollan un talo micelial forman cuerpos fructíferos denominados basidiocarpos los cuales están constituidos por hifas que se han organizado formando las distintas partes de este. Los basidiocarpos se clasifican de acuerdo al tipo de desarrollo y disposición del himenio en Angiocárpico, Gimnocárpico y Hemiangiocárpico (Valenzuela, 2004; Müller & Loeffler, 1976).

Los basidiocarpos de Auriculariaceae pueden variar desde una simple trama de hifas, como en *Helicobasidium*, hasta un cuerpo fructífero bien desarrollado y grande como en *A. polytricha*. En lo que respecta a las características macro-microscópicas de los basidiocarpos de *A. polytricha*, este desarrolla un basidiocarpo del tipo gimnocárpico, el cual presenta el himenio al descubierto desde su formación cuando las esporas están aún inmaduras. Los basidiocarpos tienen un aspecto gelatinoso y algo coriáceo, con formas muy variables, unas veces tienen forma de copa o plato aplastado, otras con aspecto de oreja con lóbulos o pliegues irregulares, de hasta 10 cm de diámetro. En cuanto a su grosor apenas pasa de 1 mm, con la cara externa aterciopelada de color gris aceitunada y la interna más oscura, de color pardo-violáceo y

con pliegues. El himenio se ubica en la cara interna y esta constituido por basidios tabicados transversalmente. La esporada es blanca y las esporas normales son alargadas, levemente arqueadas, de 14-23 x 5-8 micras (Guzmán et al, 1993).

### **Distribución y ecología de *Auricularia polytricha***

La distribución del Género *Auricularia* es amplia, concentrándose en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Sin embargo, la mayor variedad de especies de este género se pueden encontrar en China y Sud-este de Asia, que a su vez son los principales consumidores y productores a nivel mundial (Yan et al, 2004; Schenck & Dudley, 1999).

Los basidiocarpos de *A. polytricha* se encuentran con frecuencia al final del otoño e invierno, sobre troncos caídos de varios tipos de árboles como hayas, sauces, nogales y otros árboles y arbustos (Guzmán et al, 1993). La diseminación de esta especie en la naturaleza esta dada principalmente por el viento, el cual transporta pequeñas esporas, las cuales germinan siempre y cuando encuentren un sustrato adecuado. Al germinar las esporas, se da inicio al crecimiento micelial del hongo, (estructura filamentosa semejante a una fibra de algodón) el cual coloniza la mayor parte del sustrato, dando lugar finalmente a la formación de los basidiocarpos o cuerpos fructíferos (Schenck & Dudley, 1999).

Con respecto a su rol ecológico *A. polytricha* es un hongo saprófito que degrada principalmente la materia orgánica vegetal muerta (troncos de árboles caídos) provocando una rápida pudrición en la madera de color blanco. Pues consume principalmente la lignina, compuesto de fenilpropano de color pardo que le da la dureza y color característico a los troncos leñosos.

### **Técnicas de cultivo y sustratos utilizados para la producción de *Auricularia polytricha*.**

Por lo general, en la producción de setas o callampas de hongos comestibles, se distinguen básicamente cuatro etapas. La primera corresponde a la masificación y preservación de la cepa fúngica en cepario; la segunda etapa es la producción de la semilla fúngica; la tercera corresponde al acondicionamiento e inoculación de los sustratos para producir las setas y la última etapa corresponde a la inducción de setas en el sustrato (García, 1998).

Las técnicas de cultivo empleadas en la producción de *A. polytricha* son similares a las utilizadas con el hongo Shiitake; pues se cultiva mediante bolsas, que por lo general contiene como sustrato una mezcla de varios desechos agroforestales, y troncos. Este último, es el método más utilizado dado su bajo costo y sencillez tecnológica (Guzmán et al, 1993). Según el libro clásico de la agricultura China “Tang Ben Cao” la primera especie de hongos comestibles que se cultivo en el mundo fue del género *Auricularia* cerca del año 600 d.c (Yan et al, 2004). En relación a los sustratos empleados en el cultivo estos son principalmente desechos lignocelulósicos, tales como: troncos, viruta, cascarilla de arroz o aserrín esterilizado (Mau et al, 2001; García, 1998; Guzmán et al, 1993).

### ***Auricularia polytricha* como agente terapéutico**

Este hongo es conocido en la medicina oriental por sus propiedades curativas, y se recomienda principalmente como antiinflamatorio, antitumoral y regulador de la presión sanguínea. Además algunos estudios han demostrado que el consumo de este hongo en la dieta ayuda a prevenir la hipercolesteremia, la hiperlipidemia, los desordenes cardiovasculares y la bronquitis crónica. Además, también presenta características antinociceptivas, es decir, disminuye el dolor crónico. Pues estudios demostraron que inyecciones subcutáneas de cuatro

componentes aislados de *A. polytricha* disminuían notablemente el ácido acético inducido en ratas. Por otro lado, se han aislado desde basidiocarpos de *A. polytricha* compuestos, tales como: ácido ascórbico;  $\alpha$  tocoferol;  $\gamma$  tocoferol y  $\delta$  tocoferol, lo que le confiere a esta especie propiedades antioxidantes (Mau et al, 2001; Sheu et al, 2004; Mau et al, 2002).

### **Metabolitos microbianos**

Las distintas sustancias producidas durante el metabolismo microbiano se pueden clasificar en metabolitos primarios y secundarios. Los primarios son los que se producen durante la fase exponencial de crecimiento de los microorganismos. Algunos autores sugieren el termino “tropofase” para designar la fase logarítmica o exponencial, en la cual se sintetizan solo metabolitos esenciales para el crecimiento microbiano, tales como: aminoácidos, nucleótidos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, etc., o bien los intermediarios del metabolismo energético, como etanol, acetona y butanol (Walker & Gingold, 1997). Por otra parte, los metabolitos secundarios son aquellos que se forman casi al final de la fase exponencial, con frecuencia muy cerca de la fase estacionaria de crecimiento, esta etapa se designa con el nombre de “idiofase”. En ella, el microorganismo sintetiza metabolitos que difieren químicamente con los metabolitos producidos en la “tropofase”, cuya síntesis no tienen un papel relevante en el microorganismo (Walker & Gingold, 1997; Gros et al, 1985; Madigan et al, 2003). Tanto la síntesis de metabolitos primarios como secundarios están íntimamente relacionados, pues estos últimos tienden a ser sintetizados a partir de los productos intermediarios y finales del metabolismo primario. Aunque las rutas metabólicas primarias son comunes para la inmensa mayoría de microorganismos, un metabolito secundario concreto solo será sintetizado por unas pocas especies microbianas (Walker & Gingold, 1997; Madigan et al, 2003; Bu’lock, 1969).

La mayoría de los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas complejas que requieren un gran número de reacciones enzimáticas específicas para su síntesis. Estos metabolitos se caracterizan porque: no son esenciales para el crecimiento y la reproducción (son producidos a través de un metabolismo especial); su formación depende fundamentalmente de las condiciones de cultivo, sobre todo de la composición del medio; son biosintetizados a partir de los metabolitos primarios y su síntesis es restringida a ciertos géneros o especies (Gros et al, 1985; Madigan et al, 2003).

Aún no se sabe con exactitud, que es lo que gatilla la producción de dichos metabolitos, lo que si, es claro, es que ocurren fuertes cambios en el medio y en la composición enzimática de la célula, apareciendo enzimas que están específicamente relacionadas con la formación de estos metabolitos (Walker & Gingold, 1997).

### **Metabolitos secundarios producidos por hongos**

Las primeras investigaciones sobre el potencial de los basidiomicota como fuente de antibióticos fue realizado por Anchel, Hervey, Wilkins en 1941, cuando ellos examinaron extractos de cuerpos fructíferos y el micelio de 2000 especies de hongo. Gracias a éste estudio se logró aislar e identificar el pleuromutilin, un diterpeno que es aplicado en el tratamiento de infecciones por micoplasma en animales, el cual constituyó el primer antibiótico de uso comercial a partir de basidiomicetos. Desde entonces los basidiomicetos han sido considerados una fuente de nuevos antibióticos o metabolitos secundarios no explotada (Rosa et al, 2003).

Según estudios sobre las vías metabólicas de los Basidiomicota, se ha determinado que su metabolismo secundario es rico en terpenoides especialmente sesquiterpenoides ( $C_{15}H_{24}$ ), mucho de los cuales poseen estructuras que hasta ahora solo han sido detectadas en esta clase de

microorganismos, mientras que otras están estrechamente vinculadas a los metabolitos secundarios de plantas (Brizuela et al, 1998).

Los cuerpos fructíferos de algunas especies como *Lactarius* son considerados no comestibles debido a su sabor acre y picante; este sabor esta determinado por la presencia de aldehídos sesquiterpénicos con marasmanos y lactaranos en su esqueleto, que se forman enzimáticamente a partir de ácidos grasos. Estos aldehídos insaturados poseen alta actividad antimicrobiana y mutagénica (Brizuela et al, 1998). Por su parte, también se han aislado de los Basidiomicota triterpenos que tiene importante actividad biológica. Entre ellos destaca el ácido poliporénico A o ácido unguinico que tiene actividad contra microorganismos anaerobios Gram positivos y Gram negativos, y además contra hongos inferiores (Mixomycetes) (Silva et al, 1992).

### **Terpenoides o Isoprenoides**

Los terpenoides son un grupo de metabolitos secundarios más abundantes en la naturaleza, juntos con los alcaloides y compuestos fenólicos. Estos se encuentran principalmente en el reino vegetal, formando parte de los constituyentes de los aceites esenciales de plantas y flores (Silva et al, 1992). Se designan como terpenoides todo compuesto formado por unidades de 5 átomos de carbono y que sea múltiplo del esqueleto  $C_5$  del isopreno o isopentano, entre ellos destacan alcoholes, ácidos, hidrocarburos, cetonas, aldehídos, entre otros. Según el número de unidades isoprénicas que presenten se pueden clasificar en: Hemiterpenos ( $C_5H_8$ ); Monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ); Sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ); Diterpenos ( $C_{20}H_{32}$ ); Sesterpenos ( $C_{25}H_{40}$ ); Triterpenos ( $C_{30}H_{48}$ ); Tetraterpenos ( $C_{40}H_{64}$ ) y Politerpenos ( $(C_5H_8)_n$ ) (Smith & Cristol, 1970; Roberts et al, 1974; Streitwieser & Heathcock, 1989; Fox & Whitesell, 2000). Estos metabolitos pueden



presentar actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y antitumoral. Sin embargo, existen terpenoides que pueden producir efectos antagónicos en el organismo, como las curcubitacinas y dammaranos que son compuestos altamente citotóxicos en ensayos *in vitro*, pero que *in vivo* disminuyen su actividad (Silva et al, 1992).

### **Metabolitos producidos por *Auricularia polytricha***

Recientes estudios de *A. polytricha* señalan la síntesis de un factor que inhibe la aglutinación de las plaquetas, el cual esta presente en extractos acuosos purificados de *A. polytricha*. De igual forma se ha dado a conocer un factor inhibidor blastogénico, que suprime la incorporación de H-timidina en células sanguíneas mononucleares inducidas *in vitro*. Este factor inhibidor es un compuesto de bajo peso molecular que aún no ha sido aislado y que no guarda relación con el factor que inhibe las plaquetas. Por otro lado, algunos estudios señalan la síntesis de una molécula de galactosa unida a lectina, que presenta una masa molecular de 23 KDa y un pI básico. Sin embargo, la actividad fisiológica de esta lectina no esta clara aún. Por último, cabe destacar los componentes antioxidantes aislados de extractos metanólicos de *A. polytricha*, tales como: ácido ascórbico, tocoferoles y un total de fenoles (Sheu et al, 2004; Mau et al, 2001).

Hoy en día, es posible el control de ciertas enfermedades infecciosas que por décadas han provocado serios prejuicios en la salud de la población, gracias al conocimiento integrado de los procesos infecciosos, por la mejora de las prácticas sanitarias y por el descubrimiento y uso de los agentes antimicrobianos.

En la última década del siglo XX y debido principalmente al uso indiscriminado de los antibióticos, se han obtenido cepas de microorganismos resistentes a las terapias tradicionales. Esto a llevado a buscar o sintetizar nuevos y mas efectivos agentes antimicrobianos, con el fin de ser aplicados en terapias que van en post de la salud de la población humana. Si bien, es cierto, la síntesis de antibióticos es una de las prácticas más comunes, la búsqueda de compuestos sintetizados a partir del metabolismo microbiano continúa siendo la fuente principal. Ya se han informado hasta ahora cerca de 50000 productos naturales provenientes de microorganismos, de los cuales mas de 10000 son biológicamente activos y mas de 8000 son agentes antibióticos y antitumorales (Leiva et al, 2004). Por otra parte, son muchas las personas que día a día optan por consumir en su dieta alimentos naturales, no solo por su bajo costo y accesibilidad, sino por que mucho de ellos son bajos en grasas y presentan un valor nutricional mayor que los encontrados en productos elaborados. Pero, sin duda, la importancia de algunos de ellos radica en que se han encontrado diversos principios activos, los cuales han sido utilizados en terapias alternativas para curar diversas enfermedades.

En base a los antecedentes presentados se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

## Hipótesis

Desde basidiocarpos de *Auricularia polytricha* cultivados artificialmente en desechos forestales se pueden obtener metabolitos con actividad antimicrobiana.

Para responder a la hipótesis se plantea los siguientes **objetivos específicos**:

- 1.- Obtener basidiocarpos de *A. polytricha* en sustratos forestales de desecho, en condiciones de laboratorio e invernadero.
- 2.- Extraer desde los basidiocarpos, mediante métodos químicos, los posibles metabolitos con actividad antimicrobiana.
- 3.- Determinar in vitro la acción de los posibles metabolitos antimicrobianos en cepas bacterianas y fúngicas.
- 4.- Caracterizar químicamente los eventuales metabolitos que presenten actividad antimicrobiana.

### 3. MATERIAL Y METODO

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 Material biológico

En la fase experimental, se utilizó la cepa micelial del hongo *Auricularia polytricha*, adquirida en la empresa Fungi Perfecti.

Para determinar la actividad antimicrobiana in vitro se utilizaron las cepas bacterianas: *Bacillus subtilis* (ATCC 6639); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y la cepa fúngica *Candida albicans* (ATCC 90029).

##### 3.1.2 Reactivos

Los reactivos utilizados en la fase experimental se presentan en orden alfabético y se señalan en paréntesis la abreviatura usada en el texto: ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), agar extracto de malta al 2% (AEM), agar peptona (AP), alcohol absoluto, alcohol-acetona, caldo malta al 2%, Carbonato de Calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), Cloruro de Manganeso ( $\text{MnCl}_2$ ), Hipoclorito de Sodio ( $\text{NaClO}$ ), lugol, Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), safranina al 0.25 %, violeta de genciana.

##### 3.1.3 Equipos

Agitador Orbital Shaker SO1, autoclave modelo Orsa, balanza analítica Sartorius 2462, cámara cromatográfica de vidrio (22 x 18 cm), cámara de cultivo Trilab, cámara de flujo laminar Class II A/B3 Biological Safety Cabinet, cámara de frío Eurofrigo, cámara de incubación

J. Kotterman, cocina a gas Indugas, estufa de secado artesanal, estufa de secado NAPCO modelo 620, lámpara UV 220 volts 50 Hz Mineralight modelo UVSL 25, lámpara UV Siemens, microonda LG, microscopio óptico Carl Zeiss, pesa digital Precisa 2200 C, placa calefactora Spin-Master modelo NO.4803-02, rotavaporizador Guimis, secador de pelo Sindelen 1200.

### **3.1.4 Otros**

Aceite de inmersión, agua destilada estéril, aguja de siembra, algodón hidrófobo, asa de siembra, aserrín de Roble, astillas de Roble, afrechillo de trigo, bisturí, bolsas de polipropileno (25 x 50 cm), botellas de vidrio de 300 y 1000 mL, cajas de plástico (15, 5 x 22 x 10,5 cm), cajas de cartón (21,5 x 22,5 cm), capilar de vidrio, cinta adhesiva, discos de papel filtro (7 mm de diámetro), fuente de plástico de 5 y 20 L, gasa, granos de trigo, lápiz grafito, matraz Erlenmeyer de 100 y 250 mL, mechero Buschner, micropipeta de 300  $\mu$ L, mortero, olla de aluminio de 5 L, papel filtro whatman's N° 3, pipeta Pasteur, placa de sílica gel 60 F254 Merck (9,5 x 4 cm), placas Petri (15 x 100 mm), porta objeto, probeta de 500 mL Kymble, regla, sistema de filtrado, tubos de ensayo (18 x 180 mm), vaso de precipitado de 400 y 500 mL, viruta de Roble.

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Masificación de la cepa micelial de *Auricularia polytricha* en placas con agar extracto de malta al 2 % (AEM)

Para proceder a la masificación de la cepa micelial de *A. polytricha*, se extrajeron trozos de 0.5 cm<sup>2</sup> de agar con micelio a partir de placas Petri que contenían cultivos puros de dicha cepa. Con ayuda de una aguja de siembra estéril se depositó un trozo de agar, en el centro de una nueva placa que contenía AEM al 2%. Las placas sembradas se incubaron a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  hasta que el inóculo formó una colonia de 90 mm de diámetro (aproximadamente en 10 días). Luego, estas placas fueron guardadas en cámara de frío a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ . Para evitar la degeneración y envejecimiento de la cepa fue necesario realizar varias resiembras antes de su uso.

### 3.2.2 Tratamiento del sustrato para la masificación de la cepa micelial de *Auricularia polytricha*

Para incrementar la masa de micelio del hongo, se utilizó como sustrato granos de trigo. El tratamiento dado al sustrato se describe a continuación: en primer lugar el trigo a utilizar se depositó en una fuente de plástico de 5 L y se le agregó agua fría de la llave, todos aquellos elementos que flotaban en el agua se retiraron con un colador (este paso se repitió por los menos tres veces). Una vez, eliminada el agua del último lavado se depositó el trigo en una olla y por cada kilogramo de trigo húmedo se agregaron dos litros de agua fría, luego se sometió a cocción en una cocina a gas y se espero hasta que el agua hierva a  $100^\circ\text{C}$ , a partir de este momento el trigo se dejó por 20 minutos y se revolvió constantemente. Terminado el periodo de cocción se eliminó el agua de la olla y el trigo que quedó al interior de ella se lavó con abundante agua fría

(por lo menos tres veces). Eliminada el agua, se procedió a extender los granos de trigo sobre una mesa, los cuales fueron secados con un secador de pelo, de manera que su humedad no sobrepase el 50%. Luego, se pesaron 400 gramos de trigo y se depositaron en un recipiente de plástico, al cual se le adicionó 0,5 gramos de  $\text{CaCO}_3$ . Estos elementos se revolvieron hasta obtener una mezcla homogénea, la cual se traspasó a una botella de vidrio de 1000 mL de capacidad que fue sellada con un tapón de algodón y gasa. Cada botella preparada se esterilizó en autoclave (1 atm de presión a  $121^\circ\text{C}$ ) por 20 minutos, y una vez terminada la esterilización se dejaron por 24 horas a temperatura ambiente.

### **3.2.3 Inoculación y masificación del micelio de *Auricularia polytricha* en botellas con granos de trigo**

Cada botella que contenía el trigo esterilizado fue inoculada con el micelio de *A. polytricha* en una cámara de flujo laminar, ya que las condiciones de trabajo deben ser las más asépticas posible. Para ello, se extrajeron círculos de agar con micelio de 1 cm diámetro de las placas que contenían un cultivo fresco del hongo (punto 3.2.1), luego se tomaron con una aguja de siembra estéril 3 círculos que se introdujeron al interior de la botella, los cuales estaban separados entre si a una distancia de 5 cm y ubicados en la parte media de la botella. Posteriormente, cada botella sembrada se rotuló e incubó a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  por un mes.

### **3.3 Sustratos empleados en la producción de basidiocarpos de *Auricularia polytricha***

#### **3.3.1 Obtención y tratamiento de astillas de Roble**

Las astillas de Roble utilizadas para la producción de basidiocarpos de *A. polytricha* fueron obtenidas a partir de troncos caídos y recolectados en el bosque valdiviano, los cuales fueron astillados (cabe destacar que se utilizó el Roble como sustrato debido a que es una de las especies más abundantes en la X región, por lo tanto hay una mayor disponibilidad de este). El tratamiento que se le dio a las astillas consistió en depositar estas en bolsas de nylon a las cuales se le hicieron agujeros. Luego, las bolsas se dejaron remojando en un recipiente de plástico con capacidad para 20 L de agua por 24 horas. Transcurrido el tiempo, se retiraron las bolsas con las astillas del agua y se esterilizaron en autoclave (1 atm de presión a 121°C), en dos ciclos de esterilización, cada uno de 30 minutos.

#### **3.3.2 Inoculación de las astillas de Roble con el micelio masificado de *Auricularia polytricha* (Técnica de las cajas)**

En esta etapa se requiere que todo el material a utilizar se encuentre estéril. Para ello, las cajas de plástico en las cuales se depositaron las astillas esterilizadas, se desinfectaron con NaClO y luego se esterilizaron en autoclave (1 atm a 121°C) durante 15 minutos (las cajas miden 15,5 cm de ancho x 22 cm de largo x 10,5 cm de alto y a 0,5 cm de su base presentan agujeros de 0,5 cm de diámetro). Esta técnica consistió en depositar al interior de cada caja una capa homogénea de 2 cm de alto de las astilla y sobre esta se depositaron 25 g de trigo colonizado por el micelio del hongo (Semilla), el cual fue distribuido homogéneamente sobre la capa de astillas.



Luego, sobre la semilla se depositó una segunda capa de astillas de igual altura que la primera y sobre esta segunda capa se depositó nuevamente 25 g de trigo con micelio, esta metodología se aplicó hasta completar 9 cm de alto de la caja plástica. Por último, las cajas fueron tapadas con sus respectivas tapas, rotuladas y depositadas individualmente en bolsas de plástico de 25 x 30 cm (previamente esterilizadas con radiación UV), las cuales fueron selladas con cinta adhesiva y el conjunto fue incubado a  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 1 mes, hasta que el micelio del hongo colonizó por completo las astillas.

### **3.3.3 Inducción de basidiocarpos de *Auricularia polytricha* en astillas de Roble**

Aquellas cajas que presentaban una extensa superficie del sustrato colonizado por el micelio del hongo, fueron utilizadas para la inducción de los basidiocarpos. El contenido de las cajas se traspasó en forma individual a bolsas de plástico transparente de 25 x 30 cm (previamente esterilizadas por radiación UV). Luego, a cada bolsa se le hicieron pequeños cortes en forma de cruz con un bisturí estéril, en aquellos lugares en que se evidenciaba un futuro basidiocarpo (parche mucoso en la superficie del sustrato). Para inducir la formación de los basidiocarpos o setas, fue necesario cambiar las condiciones ambientales del micelio en cultivo, para ello se trasladaron las bolsas con el sustrato colonizado al invernadero perteneciente al Proyecto FONDEF DO21-1003 y se depositaron sobre estanterías de madera que se encontraban al interior de una pieza de producción de dicho invernadero. El brusco cambio de las condiciones ambientales a las que está expuesto el micelio guarda relación con una baja en la temperatura, dióxido de carbono, aumento de humedad y luz (García, 1998). En el invernadero cada bolsa fue sometida a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 80 % humedad y 9 horas luz (500- 1000 lux). Para constatar el desarrollo

de los basidiocarpos y detectar una posible contaminación del sustrato, cada bolsa fue inspeccionada a simple vista, periódicamente.

### **3.3.4 Obtención y tratamiento de mezcla FONTEC 98-1390**

Otro sustrato empleado para la producción de los basidiocarpos consistió en una mezcla utilizada en el Proyecto FONTEC 98-1390. Esta mezcla se elaboró a partir de afrechillo de trigo 19%, CaCO<sub>3</sub> 1%, viruta de Roble 30% y aserrín de Roble 50%. Cabe destacar que los desechos lignocelulósicos como aserrín y viruta también se obtuvieron de troncos caídos del bosque valdiviano. El aserrín que se utilizó fue de granulometría fina (inferior a los 2 mm recomendados), el cual se mezcló con aserrín grueso. En un fondo de plástico de 20 L de capacidad se depositaron 1368 g de afrechillo de trigo, 72 g de CaCO<sub>3</sub>, 2160 g de viruta de Roble y 3600 g de aserrín de Roble. La mezcla se revolvió homogéneamente y se depositó en bolsas de nylon, las cuales se esterilizaron en autoclave (1 atm a 121°C) en dos ciclos de 30 minutos cada uno.

### **3.3.5 Inoculación de la mezcla FONTEC 98-1390 con el micelio masificado de *Auricularia polytricha* (Técnica de las bolsas)**

En bolsas de polipropileno de 25 x 50 cm, previamente esterilizadas con UV, se procedió a colocar en su interior un estrato de la mezcla FONTEC 98-1390 y sobre esta se depositó 25 g de trigo colonizado por el micelio, se utilizó la misma técnica del punto 3.3.2 hasta formar una columna de 25 cm de altura. El peso seco de materia prima de cada bolsa fue de 600 g y a cada una se le agregó 375 ml de agua destilada estéril. Por último, las bolsas fueron rotuladas, selladas con cintas adhesivas e incubadas a 25 + 2 ° C durante un mes.

### **3.3.6 Inducción de basidiocarpos de *Auricularia polytricha* en mezcla FONTEC 98-1390**

La inducción de los basidiocarpos se realizó de la misma forma como se indicó en el punto 3.3.3.

### **3.4 Cosecha**

La cosecha comenzó cuando los basidiocarpos no crecieron más sobre los respectivos sustratos. Se procedió a elegir solamente los basidiocarpos de mayor tamaño, los cuales se cortaron desde la base del estípite (en el caso que lo tuviera) o del píleo, con un bisturí estéril. En bolsas separadas se recolectaron los basidiocarpos de cada sustrato, las cuales se trasladaron al laboratorio. Cabe destacar que durante la cosecha se trató de dejar lo menos posibles restos de cuerpos fructíferos sobre el sustrato, ya que tales residuos entran en descomposición y son de gran atractivo para agentes contaminantes.

### **3.5 Rendimiento de basidiocarpos de *Auricularia polytricha***

Para obtener datos estimativos sobre el rendimiento de *A. polytricha* en los respectivos sustratos, se realizó un análisis de correlación mediante el programa estadístico Statgraphics Versión 6.0. Para ello se midieron las siguientes variables: el diámetro del píleo (sombrero) de cada basidiocarpo cosechado, y el peso fresco y seco (para obtener el peso seco los basidiocarpos fueron puestos a secar en una estufa a 50°C durante dos días). Cabe destacar que se consideraron para el análisis solo los basidiocarpos cuyo peso fresco fue mayor de 1 gramo.

### **3.6 Micelio de *Auricularia polytricha* cultivado en caldo malta al 2%**

A partir de las placas de cultivo puro de *A. polytricha* punto 3.2.1, se trató de determinar si el micelio producía algún metabolito con actividad antimicrobiana. Para ello, se prepararon 3 botellas, cada una con 100 mL de caldo malta al 2%. A cada una de las botellas se le agregó con ayuda de una aguja de siembra estéril 3 círculos de agar con micelio de 1 cm de diámetro. Una vez, inoculadas las botellas estas se dejaron en un agitador por 45 días a 1500 rpm y a 18°C.

### **3.7 Determinación de la capacidad antimicrobiana de filtrados obtenidos de basidiocarpos y cultivos líquidos de la cepa de *Auricularia polytricha***

Una vez secos los basidiocarpos, estos fueron molidos independientemente (de acuerdo al sustrato desde donde fueron recolectados) en un mortero. De cada macerado obtenido se pesó 10 g, los cuales fueron depositados separadamente en botellas que contenían como solvente 100 mL de agua destilada estéril. Ambas soluciones se dejaron agitando por 72 horas, a 1500 rpm. Individualmente el contenido de cada botella fue filtrado a través de filtros de papel filtro Whatman 3. Lo mismo se realizó con el caldo malta en el cual creció el micelio (punto 3.6). Con los filtrados obtenidos se determinó si los basidiocarpos o el micelio en cultivo del hongo *A. polytricha* sintetiza algún metabolito con actividad antimicrobiana. Para determinar la actividad se realizaron dos experimentos. El primero consistió en depositar gotas de 25, 50, 100, 200 y 300  $\mu\text{L}$  de los filtrados, sobre placas que previamente habían sido sembradas con *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Estas placas finalmente fueron incubadas a 37°C por 24 hrs en el caso de las cepas bacterianas y a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 hrs *C. albicans*. El segundo experimento consistió en rotavaporizar por separado los

filtrados obtenidos de los basidiocarpos hasta obtener una sustancia sólida concentrada. Cada sustancia se disolvió con 5 mL de metanol y se colocó a secar en una estufa, hasta que el metanol se evaporó por completo. Se utilizó metanol como solvente en este segundo experimento debido a su alta polaridad, ya que es poco selectivo, lo que permite obtener un extracto que contenga la mayor parte de los constituyentes químicos de los basidiocarpos, principalmente compuestos hidrofóbicos. De estos extractos metanólicos se pesaron 2, 4 y 5 mg, y se depositaron en tubos que contenían 1 mL de agua destilada estéril. Discos de papel filtro estéril de 7 mm de diámetro fueron embebidos con cada solución y secados a 40°C por una hora. Luego, los discos fueron depositados sobre placas que previamente habían sido sembradas con los respectivos microorganismo patrones, las cuales fueron incubadas a 37°C y a 23 ± 2°C respectivamente.

### **3.8 Análisis químico cualitativo para identificar terpenoides**

Una vez obtenido los resultados de la prueba antimicrobiana, se hizo un análisis químico de los extractos metanólicos (tubos con 5mg/mL). Para ello, se llevó a cabo una cromatografía en capa fina (CCF), con la finalidad de determinar en estos extractos la presencia de terpenoides, ya que estos son unos de los metabolitos producidos por lo basidiomycota que presentan actividad antimicrobiana. A 1 cm del borde inferior de la placa de sílica gel se sembraron independientemente con un capilar 3 gotas de cada extracto, luego la placa fue depositada en una cámara cromatográfica que contenía la fase móvil. Para la fase móvil se ensayó con dos tipos de solventes que variaban levemente en su polaridad, se utilizó en primer lugar Tolueno: etil metil cetona (9:15), y luego Dicloro metano: acetato de etilo (1:1) (mas polar que el anterior). Una vez realizada la corrida cromatográfica (durante 12 minutos), se reveló la placa utilizando lámpara UV y un revelador específico para terpenos consistente en una mezcla de cloruro de manganeso,

metanol y ácido sulfúrico. Por otro lado, también se reveló la placa con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 30 % y temperatura ( $50^\circ\text{C}$ ). Cabe destacar que con el segundo eluyente se observó una mejor separación de los compuestos contenidos en los extractos analizados.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Masificación de la cepa micelial de *Auricularia polytricha* en placas con agar extracto de malta al 2%

En la etapa de masificación de la cepa micelial de *Auricularia polytricha* en placas con AEM al 2%, se observó un crecimiento normal del micelio blanco-algodonoso. Alcanzando las colonias un diámetro de 100 mm a los 10 días de incubación.

### 4.2 Masificación de la cepa micelial de *Auricularia polytricha* en granos de trigo

En la etapa de masificación de la cepa micelial en botellas con granos de trigo, se observó a los 30 días un 90% de colonización del trigo por el micelio del hongo. Tanto el color como el aspecto del micelio no sufrieron variaciones.

### 4.3 Crecimiento de *Auricularia polytricha* en astillas de *Nothofagus* y mezcla FONTEC 98-1390

En la Figura 1, se muestra una fotografía de la colonización de las astillas de *Nothofagus* (Roble) por el micelio de *A. polytricha*.



Figura 1. Grado de colonización del micelio de *A. polytricha* en astillas de Roble (Técnica de las cajas). a = Parche mucoso; b = Micelio

En la Figura 2, se muestra una fotografía de la colonización de la mezcla FONTEC 98-1390 por el micelio de *A. polytricha*.



Figura 2. Grado de colonización del micelio de *A. polytricha* en mezcla FONTEC 98-1390 (Técnica de las bolsas). a = Parche mucoso; b = Micelio



En la Figura 1, se observa el grado de colonización de las astillas de *Nothofagus* por el micelio de *A. polytricha*. Cada bloque de astillas presentó a los 30 días de incubación un 80 % de la superficie colonizada. El micelio que se desarrolló entre las astillas era de color blanco-algodonoso, y en algunos sectores del bloque se observaron parches mucosos de color amarillo. Por su parte, en la Figura 2, se observa una colonización parcial del sustrato por el micelio. A los 30 días de incubación cada bolsa sembrada presentó un 50 % de colonización, y en algunos sectores de las bolsas también se observaron parches mucosos de color amarillo. Con respecto a las características del micelio estas son las mismas descritas en la técnica de las cajas.

#### 4.4 Desarrollo de los basidiocarpos en astillas de Roble y mezcla FONTEC 98-1390

Las Figuras 3 y 4, muestran los basidiocarpos de *A. polytricha* generados en las astillas de Roble y mezcla FONTEC 98-1390.

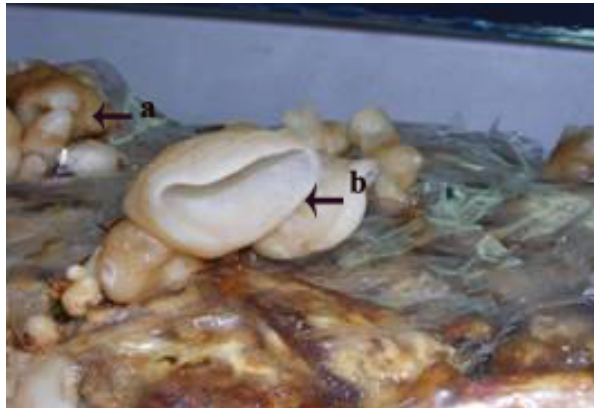


Figura 3. Basidiocarpos obtenidos en astillas de Roble. a = Estados de desarrollo del basidiocarpo; b = basidiocarpo

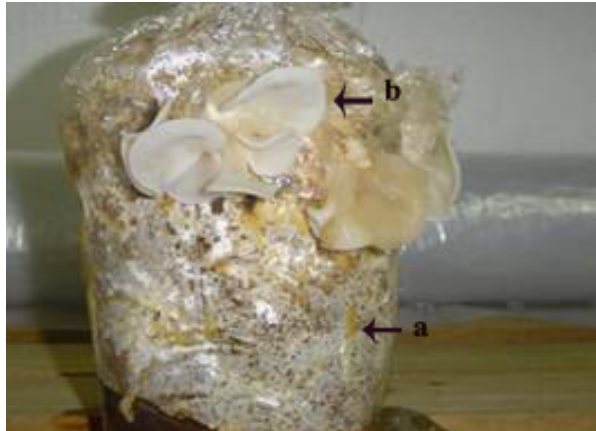


Figura 4. Basidiocarpos obtenidos en mezcla FONTEC 98-1390. a = Parche mucoso;  
b = basidiocarpo

Como se puede apreciar en la Figura 3, en las astillas de Roble se obtuvieron principalmente basidiocarpos en forma de copas y algunos en rosetas, que presentan en su cara interna una tonalidad blanca y en su cara externa aterciopelada un tono beige a café. Los basidiocarpos se desarrollaron a los 10 días posteriores a la inducción. Sobre la superficie del sustrato (Fig 3) se puede observar los primeros estados de desarrollo de los basidiocarpos, estos son pequeñas esferas ovoides cartilaginosas. El tamaño de los basidiocarpos fue relativo, ya que el diámetro del píleo varió entre 1.5-5.0 cm y la longitud del basidiocarpo (distancia desde el estípite hasta el píleo) varió entre 1.5-3.5 cm. En tanto que en la Figura 4, se puede observar los basidiocarpos obtenidos en la mezcla FONTEC 98-1390, estos presentan forma de roseta y de oreja con lóbulo de color blanco en su cara interna y un suave tono beige a blanco en su cara externa. Estos basidiocarpos se desarrollaron a los 12 días de inducidos. El diámetro del píleo varió entre 3 a 7 cm (no presentaron un estípite notorio).

#### 4.5 Determinación de la capacidad antimicrobiana de los filtrados obtenidos de basidiocarpos y del cultivo líquido micelial de *Auricularia polytricha*

##### 4.5.1 Método de las gotas

En la Tabla 1, 2 y 3 se muestra los resultados obtenidos de la prueba antimicrobiana in vitro a partir de extractos acuosos de *A. polytricha*

Tabla 1. Determinación antimicrobiana, sobre cepas patrones, de filtrados obtenidos desde basidiocarpos cultivados en astillas de Roble.

Volumen de filtrado (µl)	<i>Bacillus subtilis</i> (halo de inhibición)	<i>Staphylococcus aureus</i> (halo de inhibición)	<i>Escherichia coli</i> (halo de inhibición)	<i>Candida albicans</i> (halo de inhibición)
25	-	-	-	-
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	-	-	-	-
300	-	-	-	-

(-) = No hay inhibición

Tabla 2. Determinación antimicrobiana, sobre cepas patrone, de filtrados obtenidos desde basidiocarpos cultivados en mezcla FONTEC 98-1390.

Volumen de filtrado ( $\mu$ l)	<i>Bacillus subtilis</i> (halo de inhibición)	<i>Staphylococcus aureus</i> (halo de inhibición)	<i>Escherichia coli</i> (halo de inhibición)	<i>Candida albicans</i> (halo de inhibición)
25	-	-	-	-
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	-	-	-	-
300	-	-	-	-

(-) = No hay inhibición

Tabla 3. Determinación antimicrobiana, sobre cepas patrones, de filtrados obtenido del cultivo de *Auricularia polytricha* en caldo malta al 2 %.

Volumen de filtrado ( $\mu$ l)	<i>Bacillus subtilis</i> (halo de inhibición)	<i>Staphylococcus aureus</i> (halo de inhibición)	<i>Escherichia coli</i> (halo de inhibición)	<i>Candida albicans</i> (halo de inhibición)
200	-	-	-	-
300	-	-	-	-

(-) = No hay inhibición

Como se puede apreciar en la tabla 1, 2 y 3 tanto los filtrados obtenidos desde basidiocarpos como del cultivo líquido de *A. polytricha* no presentaron actividad antimicrobiana en las cepas patrones. Ya que no se observó la formación de un halo de inhibición en las placas. Las cepas bacterianas crecieron normalmente sobre las gotas de los filtrados al igual que la cepa fúngica.

#### 4.5.2 Método de los discos de papel filtro

En la Figura 5, 6, 7 y 8 se muestra los resultados de la prueba antimicrobiana a partir de extractos metanólicos de *A. polytricha*. La letra M corresponde al disco embebido con 5 mg/mL de los basidiocarpos cultivados en mezcla FONTEC 98-1390 y la letra A corresponde al disco embebido con 5 mg/mL de los basidiocarpos cultivados en astillas de Roble.



Figura 5. Tapiz de *Bacillus subtilis*



Figura 6. Tapiz de *Staphylococcus aureus*



Figura 7. Tapiz de *Escherichia coli*

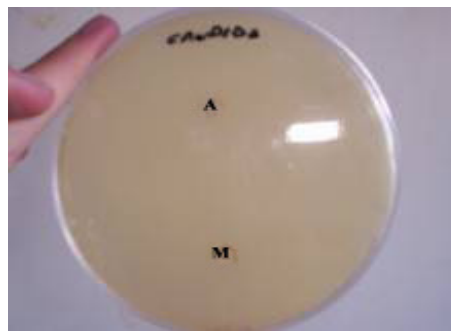


Figura 8. Tapiz de *Candida albicans*

Como se puede apreciar en la Figura 5, 6, 7 y 8, las placas después de ser incubadas a 37°C (cepas bacterianas) y  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  (cepa fúngica) por 24 horas, mostraron un crecimiento normal de las cepas patrones alrededor de los discos, por lo tanto no se observaron halos de inhibición.

#### 4.6 Análisis químico cualitativo de extractos metanólicos de *Auricularia polytricha* para determinar terpenoides

El análisis químico cromatográfico realizado a los extractos metanólicos de los basidiocarpos y al filtrado del cultivo líquido de *A. polytricha* (punto 3.7), dio como resultado al revelar con lámpara UV y con un revelador específico para terpenos, la ausencia de estos metabolitos tanto en los basidiocarpos como en el micelio, ya que no se observaron manchas rosadas en la placa cromatográfica. Por otro lado, al utilizar un revelador común para todo tipo de metabolito, como ácido sulfúrico al 30%, es posible observar que los extractos analizados presentan diferentes tipos de metabolitos.

En la Figura 9, se muestra los resultados de la cromatografía de capa fina realizado a los extractos metanólicos y al filtrado del cultivo liquido de *A. polytricha*, utilizando como revelador cromatográfico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 30 %. En la placa cromatográfica, se indica con la letra M el filtrado obtenido del micelio cultivado en caldo malta al 2 %; con el número 1 el extracto obtenido de los basidiocarpos cosechados de las astillas de Roble (técnica de las cajas) y el 2 corresponde a los extractos obtenidos de los basidiocarpos cosechados de la mezcla FONTEC 98-1390 (técnica de las bolsas).

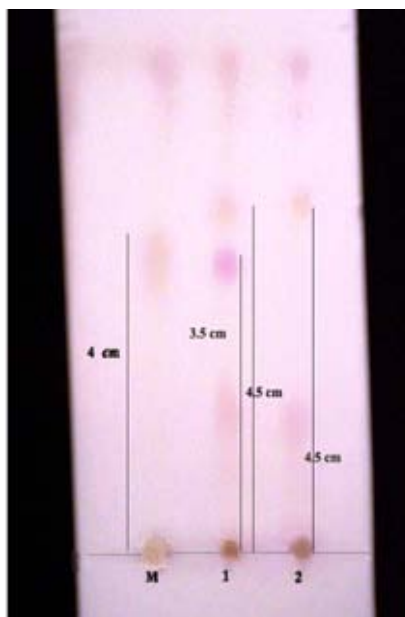


Figura 9. Placa cromatográfica revelada con ácido sulfúrico al 30 %.

Como se puede observar en la Figura 9, al revelar con ácido sulfúrico al 30 % y temperatura (50°C), es posible observar a simple vista que el filtrado del cultivo liquido y los extractos de los basidiocarpos de *A. polytricha*, producen distintos tipos de metabolitos. Ya que en la placa cromatografica se evidencian manchas de diferentes colores. En la muestra M se observa una mancha amarilla con un Rf de 0,57; En la muestra 1 se observa una mancha rosada con un Rf de 0,5 y una amarilla con un Rf de 0,64; En la muestra 2 se observa una mancha

amarilla que presenta un Rf de 0.64, lo que hace presumir que ese metabolito es un constituyente común en ambos basidiocarpos.

#### 4.7 Rendimiento de basidiocarpos de *Auricularia polytricha* en los sustratos ensayados.

La Figura 10, 11 y 12 indican las relaciones existentes entre el diámetro del píleo (tamaño del basidiocarpo) con el peso fresco y peso seco; y la proporción final de biomasa expresada en porcentaje.

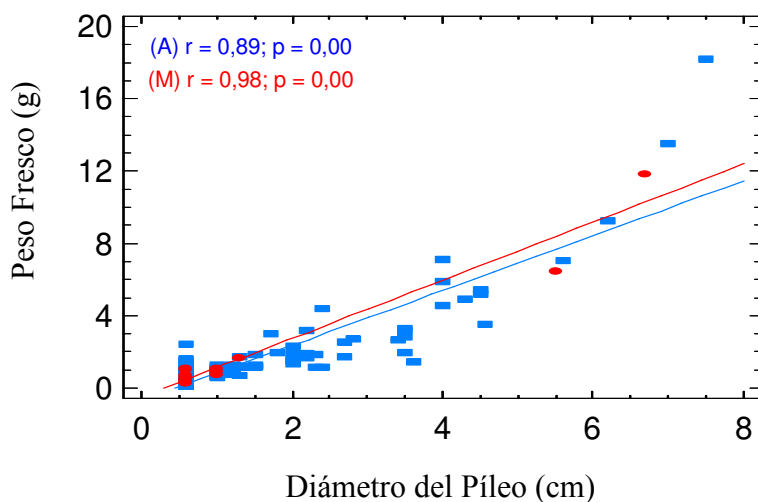


Figura 10. Relación entre el peso fresco de los basidiocarpos obtenidos en las astillas de Roble ( $\square$ ) y la mezcla FONTEC 98-1390 ( $\circ$ ) en función del tamaño del píleo.



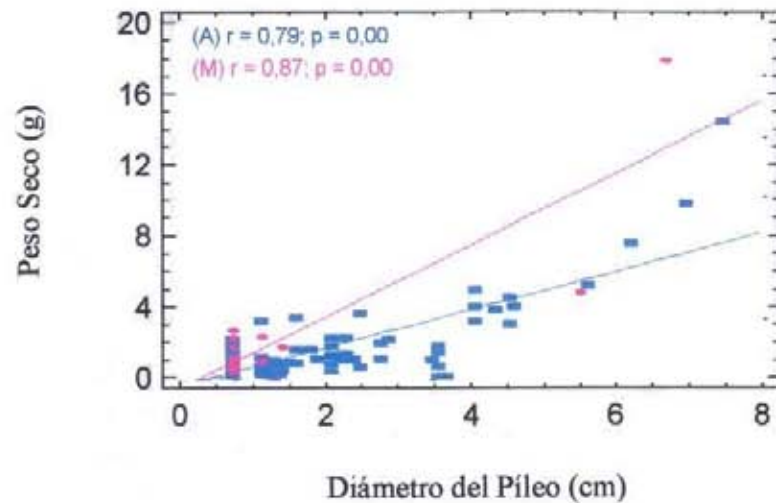


Figura 11. Relación entre el peso seco de los basidiocarpos obtenidos en las astillas de Roble ( $\square$ ) y la mezcla FONTEC 98-1390 ( $\circ$ ) en función del tamaño del píleo.

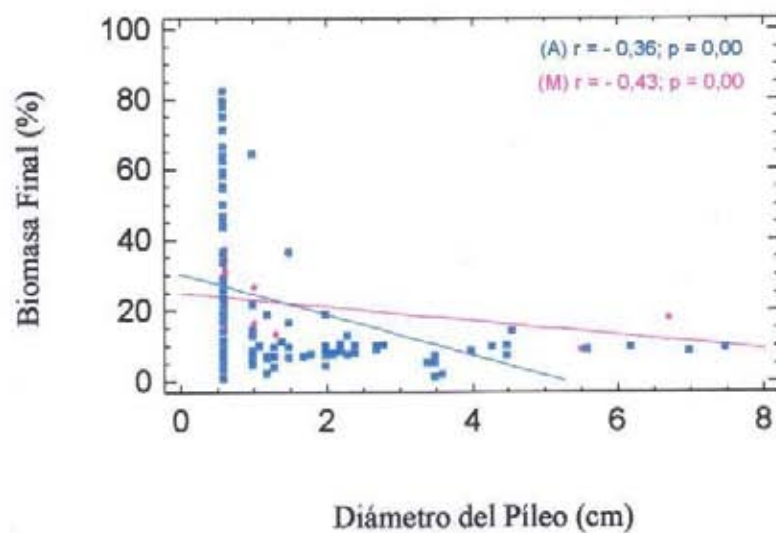


Figura 12. Relación entre la biomasa final de los basidiocarpos obtenidos en las astillas de Roble ( $\square$ ) y la mezcla FONTEC 98-1390 ( $\circ$ ) en función del tamaño del píleo.

Como se puede apreciar en la Figura 10, existe una relación directa entre el tamaño del basidiocarpo y el peso fresco del hongo. Es decir, a mayor tamaño del basidiocarpo, este contendrá una mayor cantidad biomasa (micelio + agua). La relación, es además estadísticamente significativa en relación al tamaño de muestreo. Evidentemente, a mayor tamaño del basidiocarpo, la biomasa producida por éste es mayor.

De manera análoga, la Figura 11 muestra una relación directa entre el tamaño del basidiocarpo y el peso seco. Mientras mas grande es el basidiocarpo, mayor será su peso fresco y por ende mayor será su peso seco (sólo micelio).

En la Figura 12, se muestra una proporción indirecta entre el tamaño del basidiocarpo y el porcentaje de biomasa perdida por el hongo. Según el tipo de tratamiento que se de para cultivar el hongo, dependerá el porcentaje de biomasa perdida. Es decir, los basidiocarpos cosechados de la mezcla FONTEC 98-1390 (○) que presentan un mayor tamaño, perderán menos biomasa (la pendiente es menor en la recta), en comparación con los basidiocarpos cosechados en las astillas de roble (□), cuya pérdida de biomasa es mayor a medida que el tamaño del basidiocarpo aumenta (la pendiente es mayor en la recta). Sin embargo, en ambos tratamientos se puede obtener una óptima productividad, es decir, una menor pérdida de biomasa cuando se cosechan basidiocarpos cuyo tamaño fluctúan entre 1 y 2 cm (intersección de ambas rectas).

## 5. DISCUSION

La industria forestal en Chile ha experimentado un crecimiento notable en la última década, el cual no siempre ha ido de la mano con la protección ambiental provocando un incremento y acumulación de residuos forestales, provenientes principalmente del aserrado de la madera, los cuales son acumulados en aserraderos o son eliminados mediante quema o en cursos de agua. Al respecto Andrade y Valenzuela (2002) señalan que los desechos de aserrín generan grandes problemas de contaminación, pues contamina el suelo, los cursos de agua, restringe la superficie útil del suelo y genera problemas ambientales por incendios y autocombustión. Un proceso de reconversión ecológica eficaz es sin duda el cultivo de hongos comestibles lignolíticos a partir de estos desechos, pues lo que al ser humano le es poco útil y que desecha de la industria forestal y agrícola (aserrín, astillas, viruta, paja de arroz, afrechillo de trigo, etc.) el hongo lo utiliza como fuente de nutrientes, degradándolo aeróbicamente a través de su sistema enzimático. De acuerdo a Martín et al., (2004); Valdebenito (1997) y Lobos (1996) las características ecológicas y metabólicas de los hongos lignolíticos permiten que sean excelentes degradadores naturales de compuestos xenobióticos. Por otro lado, su capacidad de desarrollarse sobre residuos agrícolas y forestales de bajo costo y el hecho de que sus inóculos puedan ser producidos masivamente mediante técnicas convencionales, les hace candidatos para su utilización en procesos de biorrecuperación. Según Valdebenito (1997) este grupo de hongos corresponden a los más eficientes degradadores descritos hasta la fecha y a las especies más evolucionadas.

Sin embargo, en Chile, el cultivo y consumo de hongos comestibles es una práctica poco habitual en comparación con otros países de Sud-América y Asia, debido principalmente al

desconocimiento de las técnicas de cultivo, de las especies de hongos comestibles como de las propiedades nutricionales y medicinales que presentan estos hongos.

De acuerdo a lo señalado por Guzmán et al, (1992) y France (2002) Chile sería un país principalmente micófono, ya que en lo hábitos alimenticios de la población no se ha incorporado el consumo masivo de hongos comestibles. Lo que queda demostrado por el bajo consumo per cápita que no supera los 70 g al año, cifra muy por debajo de los países orientales o desarrollados, tales como Holanda que consume 7 Kg/habitantes/año.

A pesar que el consumo local de hongos es minoritario, Chile es un importante proveedor de hongos silvestres comestibles a la Unión Europea y EE.UU. Las exportaciones representan mas de 2 millones de dólares al año y el 90 % de ellas la constituyen especies como *Suillus luteus* y *Lactarius deliciosus*, las que son exportadas deshidratadas o en salmuera, principalmente a EE.UU y Alemania (Valenzuela, 2003; Manríquez, 1991).

Hasta el momento se cultivan artificialmente dos especies que presentan gran aceptación en la población, la primera corresponde a *Agaricus bisporus* (Champiñón de París) y la segunda a *Pleurotus ostreatus* (Hongo Ostra), cuya productividad solo satisface la demanda nacional. El ensayar nuevas técnicas de cultivo para especies saprofitas comestibles de importancia internacional, tales como: *Auricularia polytricha*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus eryngii*, *Volvariella volvacea*, entre otras, puede abrir un mercado interesante desde el punto de vista económico, pues se podrían utilizar los desechos de la industria forestal para producirlas. Para ello, sin embargo, resulta indispensable determinar las condiciones de cultivo y los sustratos empleados para una óptima productividad en el país.

### **5.1 Masificación de la cepa micelial de *Auricularia polytricha* en placas con agar extracto de malta al 2%**

De acuerdo a los resultados señalados en el punto 4.1, se logró masificar mediante varias resiembras la cepa micelial *A. polytricha* en agar extracto de malta al 2%. Este medio de cultivo empleado como sustrato en la primera etapa de producción del hongo es un medio común constituido por malta tostada, levadura y agar, que le proporciona al hongo los nutrientes requeridos para su crecimiento y desarrollo. Tanto la composición del medio de cultivo, como el pH del mismo y la temperatura de incubación ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) a la cual fue expuesta el hongo fueron factores determinantes en el crecimiento óptimo del micelio. Pues según Guzmán et al, (1993) y García, (1998) la especie *Auricularia* crece a un pH de 4.5 a 7 y a una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### **5.2 Masificación de la cepa micelial de *Auricularia polytricha* en granos de trigo**

De acuerdo a los resultados señalados en el punto 4.2 en la segunda etapa de masificación de *A. polytricha* en granos de trigo, se logró que el micelio colonizara por completo el nuevo sustrato. Guzmán et al, (1993) señala que se pueden utilizar como sustrato materiales lignocelulósicos como pajas de arroz, viruta o aserrín de diversas maderas o semillas de diversas gramíneas, tales como trigo, sorgo, centeno, mijo y arroz. Cada grano de trigo contiene almidón, proteínas, lípidos, ceniza, fibra, vitaminas (principalmente del complejo B) y un 14% de humedad, lo que constituye una importante fuente de carbono y energía para el hongo. Sin embargo, también es una fuente de nutrientes para diversos microorganismos. Pues en algunas botellas de trigo sembradas, se observó la presencia de agentes contaminantes principalmente

hongos del genero *Mucor* y *Penicillium*, de acuerdo a Guzmán et al, (1993 ) esto sería producto de una mala manipulación de los granos de trigo después de la esterilización.

### **5.3 Crecimiento de *Auricularia polytricha* en astillas de *Nothofagus* y mezcla FONTEC 98-1390**

En relación a los resultados señalados en el punto 4.3, el micelio de *A. polytricha* colonizó por completo las astillas de Roble en contraste con la mezcla FONTEC 98-1390. Debido a que la cantidad de sustrato de las cajas (400 g) fue menor en comparación con el contenido de las bolsas (600 g), lo que generó una colonización mas rápida del micelio en las astillas, y por ende una mayor degradación. En relación a la elección del sustrato para el cultivo, Guzmán et al (1993) y García (1998) indican que es importante considerar su disponibilidad, bajo costo, tiempo de almacenamiento y humedad que presente, así como esté libre de contaminación biológica (por otros microorganismos) y/o química (funguicidas). Por su parte, también señalan que el crecimiento de un hongo en un sustrato determinado esta estrechamente relacionado con: los requerimientos nutritivos de la especie, la ausencia de sustancias antifisiológicas que afecten el crecimiento del micelio, la textura del sustrato, el pH del mismo y la durabilidad que presente el sustrato. En relación a la degradación de sustratos lignocelulósicos por microorganismos, Valdebenito (1997) señala que esta limitada por múltiples factores como: el contenido de extraíbles algunos de los cuales pueden actuar como biocidas; el contenido de nitrógeno; pH y principalmente el contenido de lignina, ya que cuando sobrepasa el 20 %, el sustrato es difícil de degradar.

#### 5.4 Desarrollo de los basidiocarpos en astillas de Roble y mezcla FONTEC 98-1390

De acuerdo a los resultados señalados en el punto 4.4, se obtuvieron basidiocarpos en forma de copa, roseta, platos aplastados y algunos con aspecto de orejas con lóbulos cuyas tonalidades en su cara externa fueron de color beige, café y blanco. Al respecto Alexopoulos (1966) señala que el color de los basidiocarpos de *Auricularia* puede variar de café claro o púrpura a gris o negrozco según la especie y estado de desarrollo.

En relación a los sustratos empleados para el cultivo de *Auricularia*, se utilizan en la actualidad diferentes especies de árboles y arbustos, tales como: *Quercus* sp (Encino y Roble); *Citrus* sp (Naranja y Limonero); *Acacia* sp (Acacia); *Persea americana* (Palto); *Alnus* sp (Aliso); *Betula* sp (Abedules); *Acer* sp (Arces), entre otros, los cuales son utilizados principalmente en el cultivo de la especie fúngica en troncos. Por su parte, en el cultivo en bolsas se utiliza un compost constituido principalmente por aserrín (de madera de árboles de hojas anchas), salvado y Carbonato de Calcio (Guzmán et al, 1993; García, 1998). Con respecto a los sustratos ensayados, estos fueron óptimos para el cultivo de *A. polytricha*, ya que tanto en las astillas de Roble como la mezcla FONTEC 98-1390 (en base a viruta, aserrín de Roble y afrechillo de trigo) se logró obtener basidiocarpos. En lo referido a las técnicas de cultivo de *Auricularia*, diversos autores señalan que su cultivo en troncos y en bolsas (las cuales contienen un compost constituido por varios desechos agroforestales) son las técnicas más eficaces para la obtención de basidiocarpos de este hongo, pues en la mayoría de los trabajos se recomiendan estas dos técnicas para obtener óptimos resultados. Sin duda, que el cultivo de *A. polytricha* en astillas de Roble abre una nueva puerta para la producción de esta especie a escala comercial, resultando ser más rentable en comparación con las dos técnicas antes señaladas en cuanto a gastos de producción, pues se requiere solamente de astillas de *Nothofagus* (Roble) y de la semilla de *A. polytricha*, en contraste

con la técnica de las bolsas que necesita de varios materiales agro-forestales. Por su parte, el cultivo en tronco presenta la desventaja que demora demasiado tiempo en producir basidiocarpos (entre 60 días a un año), y además, ocupa un mayor espacio en comparación con el cultivo en bolsas y cajas que contienen astillas.

### **5.5 Determinación de la capacidad antimicrobiana de los filtrados obtenidos desde basidiocarpos y del cultivo micelial de *Auricularia polytricha***

De acuerdo a los resultados señalados en el punto 4.5, se determinó a través del método de las gotas y de los discos de papel filtro, que tanto el micelio como los extractos acuosos y metanólicos de los basidiocarpos de *A. polytricha* no presentan actividad inhibitoria para las cepas de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Dado la ausencia de halos de inhibición alrededor de las gotas y de los discos de papel filtro. La inactividad de los respectivos extractos puede ser a raíz de que la maceración de los basidiocarpos no fue la adecuada, ya que quizás no se rompieron las células adecuadamente lo que impidió que se disolvieran los posibles componentes activos en los respectivos solventes. Por su parte, Jonathan & Fasidi (2003) señalan que la actividad antimicrobiana de los hongos *Lycoperdon giganteum* y *Lycoperdon pusillum* varía notablemente según el tipo de solvente utilizado en la extracción. Pues los extractos etanólicos de estos hongos mostraron una mayor actividad antimicrobiana en comparación con extractos acuosos y metanólicos, ya que el número de microorganismos inhibidos y el diámetro de la zona inhibida fue mayor. A su vez estos mismos autores señalan que la técnica de los discos de papel filtro no es un método eficaz para medir la actividad antimicrobiana, ya que el disco podría actuar como barrera entre el extracto y



el microorganismo, impidiendo la difusión de los componentes activos en el medio. Además, Yang (2000) indica que los compuestos activos altamente hidrofóbicos no difunden en agar, por lo tanto compuestos, tales como terpenos quizás no difundieron sobre el tapiz de microorganismos. Por otro lado, la inactividad de los respectivos extractos puede estar dada quizás, porque las cepas patrones son resistentes frente a determinados constituyentes activos de estos. Por su parte Leiva (2004) y Madigan et al (2003), señalan que la resistencia de ciertos patógenos puede deberse a varios factores, entre ellos: carecer de la estructura que inhibe el antibiótico, por ejemplo los micoplasmas, no presentan una pared celular típica, por lo que son resistentes a las penicilinas; ser impermeable al antibiótico; ser capaz de alterar el antibiótico inactivándolo; poder modificar la diana del antibiótico; bombear hacia fuera el antibiótico que haya entrado a la célula (eflujo) y mutaciones espontáneas que incorporan nuevos genes otorgándole una notable plasticidad genética al microorganismo. Por otro lado, las cepas de microorganismos utilizadas en la prueba antimicrobiana in vitro no representan la gran variabilidad de microorganismos patógenos existente que pudieran ser inhibidos, por tales metabolitos activos. Por otra parte, Walker & Gingold (1997); Madigan et al (2003) y Mateos (2005) señalan que el metabolismo secundario de un determinado microorganismo, en este caso de *A. polytricha*, puede ser reprimido por componentes que presenta el medio. Por ejemplo, la glucosa tiene un efecto represor sobre la formación de benzil-penicilina. Por otro lado, el fosfato y el nitrógeno también son represores del metabolismo secundario, pues el primero reprime la síntesis de estreptomicina y tetraciclina, y el segundo reprime la síntesis de penicilina. A su vez el carbono que es una fuente de energía importante en el crecimiento microbiano, suele conducir a un metabolismo secundario débil. Por lo tanto, tales componentes pudieran inhibir directamente a las enzimas que participan en la síntesis del determinado metabolito, provocando el bloqueo de la

ruta biosintética. Por otra parte, el hongo *A. polytricha* puede que este condicionado genéticamente y no sintetice un metabolito antimicrobiano, ya que según Walker & Gingold (1997), no todos los microorganismos desarrollan un metabolismo secundario. Al respecto Rosa et al (2003), determinaron la actividad antimicrobiana de 84 especies de basidiomicotas recolectadas en Brazil, entre las cuales estaba *A. fuscosuccinea*. Los resultados concluyeron que el extracto obtenido del basidiocarpo no presentaba agentes antimicrobianos, dado que en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana no se observaron halos de inhibición. Por lo tanto, podría ser que esta cepa al igual que *A. fuscosuccinea* no biosintetice dichos metabolitos.

#### **5.6 Análisis químico cualitativo de extractos metanólicos de *Auricularia polytricha* para determinar terpenoides**

De acuerdo a los resultados señalados en el punto 4.6 el análisis químico cromatográfico, corroboraría en cierto modo la ausencia de componentes activos antimicrobianos como terpenos u otros en los extractos metanólicos de los basidiocarpos y del cultivo líquido de *A. polytricha*

#### **5.7 Rendimiento de basidiocarpos de *Auricularia polytricha* en los sustratos ensayados.**

En relación a los resultados del rendimiento de *A. polytricha* en los sustratos ensayados se obtuvo una mayor productividad de basidiocarpos a partir de la mezcla FONTEC 98-1390, al respecto Manríquez (1991); Guzmán et al (1993) y García (1998) señala que la composición variable del sustrato, asimismo, lleva a variaciones en la producción de carpóforos. Aquellos sustratos constituidos por un tipo de material lignocelulósicos producen rendimientos considerablemente menores que aquellos sustratos enriquecidos con aditivos celulósicos

provenientes de desechos agrícolas. Cabe destacar, que existe muy poca literatura sobre el rendimiento de *A. polytricha* lo que dificulta en cierto modo la comparación de resultados.

## 6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados presentados y discutidos se desprenden las siguientes conclusiones:

El hongo *Auricularia polytricha*, se puede cultivar en condiciones de laboratorio e invernadero sobre sustratos artificiales derivados de desechos agroforestales, tales como: astillas de Roble y mezcla FONTEC 98-1390, dado que ambos sustratos cumplen los requerimientos nutritivos demandados por la especie, pues están constituidos principalmente de lignina y celulosa, nutrientes indispensable en los hongos lignocelulolíticos.

Los extractos obtenidos del micelio y basidiocarpo de *Auricularia polytricha*, no producen metabolitos bioactivos frente a las cepas patrones.

De los dos tipos de tratamientos utilizados en el cultivo de *Auricularia polytricha*, el más eficaz en cuanto a productividad correspondió a la mezcla FONTEC 98-1390. Pues, los hongos que crecieron sobre este sustrato presentaron un mayor tamaño y una menor pérdida de biomasa.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente la Hipótesis se rechaza

## 7. LITERATURA CITADA

**Alexopoulos, C.** (1966). Introducción a la micología. Editorial Universitaria de Buenos Aires. 615 pp.

**Andrade, N. & Valenzuela, E.** (2002). Aserrín de pino pretratado con cepas fúngicas como sustrato para la producción de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Agro sur. 30: 28-34.

**Brizuela, M., Garcia, L., Perez, L. & Mansur, M.** (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Rev. Iberoam. Micol. 15: 69-74.

**Bu'lock, J.** (1969). Biosíntesis de productos naturales. Introducción al metabolismo secundario. Ediciones URMO. 184 pp.

**Fox, M. & Whitesell, J.** (2000). Química Orgánica. 2ª Edición. Addison Wesley Longman, S.A. México. 1232 pp.

**France, A.** (2002). Producción de hongos comestibles. Boletín INIA N° 23. [http://www.sitec.cl/DOC/Produccion\\_hongos.doc](http://www.sitec.cl/DOC/Produccion_hongos.doc). (página revisada el 10-5-2005)

**García, M.** (1998). Cultivo de Setas y Trufas. Ediciones Mundi- Prensa. 3ª Edición. 217 pp.

**Gros, E., Pomilio, A., Seldes, A. & Burton, G.** (1985). Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaria general de la organización de los estados americanos. Programa regional de desarrollo científico y tecnológico. Washington, D.C. 146 pp.

**Guzmán, G., Mata, G., Salmones, D., Soto, C. & Guzmán, L.** (1993). El cultivo de los hongos comestibles. Instituto politécnico nacional. Dirección de bibliotecas y publicaciones, Tresguerras 27, 06040 México, D.F. pp 245.

**Jonathan, S. & Fasidi, I.** (2003). Antimicrobial activities of two Nigerian edible macro-fungi- *Lycoperdon pusillum* (Bat.Ex) and *Lycoperdon Giganteum* (Pers.). African Journal of Biomedical Research. 6: 85-90.

**Leiva, S., Yañez, M., Zaror, L., Rodríguez, H. & Garcia, H.** (2004). Actividad antimicrobiana de actinomicetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. Revista médica de Chile. 132:151-159.

**Lobos, C.** (1996). Determinación de enzimas lignolíticas en cepas de *Peniophora pini* (Sch eich. ex Fr.) Boidin y *Pleuroflammula croceo-sanguinea* (Mont) sing. Proposición de un modelo de estudio. Tesis, Escuela de Tecnología Medica. Facultad de Medicina.. Universidad Austral de Chile, 24 pp.

**Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J.** (2003). Brock Biología de los Microorganismos. 10ª Edición. Pearson Educación, S.A Madrid. pp 1096.

**Manríquez, D.** (1991). Rendimiento de *Pleorotus ostreatus* (Jack.ex Fr.) cultivado sobre substratos de aserrín. Tesis, Escuela de Ingeniería Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Austral de Chile, 48 pp.

**Martín, C., Gonzáles A. & Blanco, M.** (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Rev Iberoam Micol. 21: 103-120.

**Mateos, P.** (2005). Producción industrial de metabolitos secundarios. <http://edicion-micro.usual.es/web/SEFIN/MI/tema08MI.html>. pp 1-7 (página revisada 12-10-2005)

**Mau, J., Chao, G. & Wu, K.** (2001). Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. Journal Agricultural and Food Chemistry. 49: 5461-5467.

**Mau, J., Lin, H. & Chen, Ch.** (2002). Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. Journal Agricultural and Food Chemistry. 50: 6072-6077.

**Müller, E. & Loeffler, W.** (1976). Micología. 2ª Edición. Ediciones Omega, S.A. 340 pp.

**Roberts, J., Stewart, R., Caserio, M.** (1974). Química orgánica de metano a macromoléculas. Fondo Educativo Interamericano, S. A. 787 pp.

**Rosa, L., Gomez, Kátia., Jacob, C., Capelari, M., Rosa, C., Zani, C.** (2003). Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. 98 (7): 967-974.

**Schenck, S. & Dudley, N.** (1999). Wood ear (Pepeiao) production in forest understory. Hawaii Agriculture Research Center. Forestry report 1. 1-4 pp.

**Sheu, F., Chien, P., Chien, A., Chen, Y. & Chin, K.** (2004). Isolation and characterization of an immunomodulatory protein (APP) from the Jew's ear mushroom *Auricularia polytricha*. Food Chemistry. 87: 593-600.

**Silva, M., Bittner, M., Hoeneisen, M., Becerra, J., Campos, V., González, F., Céspedes, C. & Marambio, O.** (1992). Química de los triterpenos. Secretaria general de la organización de los estados americanos. Programa regional de desarrollo científico y tecnológico. Washington, D.C. 353 pp.

**Smith, L. & Cristol, S.** (1970). Química orgánica. Editorial Reverté, S.A. 793-808 pp.

**Streitwieser, A. & Heathcock, C.** (1989). Química orgánica. 3<sup>a</sup> Edición. Editorial Mc GRAW-HILL. 1224-1244 pp.

**Torres, M. & Ríos, A.** (2005). Potencial de la microbiota nativa comestible y medicinal en el municipio de Quibdó. Universidad Tecnológica del Chocó. Colombia. <[http://www.reuna.edu.co/temporales/memorias/especies/hongos/3\\_microbiota%20nativa%20medicinal%20definitiva.htm](http://www.reuna.edu.co/temporales/memorias/especies/hongos/3_microbiota%20nativa%20medicinal%20definitiva.htm)>(pagina revisada el 6-1-2005).

**Valdebenito, M.** (1997). Determinación de la capacidad degradativa de cepas miceliales obtenidas de *Pleuroflammula croceosanguinea* (Mont.) Sing. y *Descolea antarctica* Sing. sobre aserrín de *Nothofagus obliqua* y *Weinmannia trichosperma*. Tesis, Escuela de Ciencias. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile, 33 pp.

**Valenzuela, E.** (2003). Hongos comestibles silvestres colectados en la X Región de Chile. Boletín Micológico. 18: 1-14.

**Valenzuela, E.** (2004). Guía de hongos. Instituto de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. 50 pp.

**Waldi, D.** (1965). Spray-reagents thin-layer chromatography. Editado por Stahl. 484-503 pp.

**Walter, I. & Gingold, E.** (1997). Biología molecular y biotecnología. 2ª Edición. Editorial ACRIBIA, S.A. 475 pp.



**Yan, P., Luo, X. & Zhou, Q.** (2004). RAPD molecular differentiation of the cultivated strains of the jelly mushrooms, *Auricularia auricula* and *A. polytricha*. *World journal of microbiology & Biotechnology*. 20: 795- 799.

**Yang, Z.** (2000). Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Department of food technology, University of Helsinki. 61 pp.

**ANEXO**

## **Anexo I**

### **Preparación de reveladores cromatográficos**

#### **Revelador específico para terpenos**

##### **1) Mezcla en base a Cloruro de Manganeso**

En un matraz de 250 ml se agregan 75 mL de  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 3 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y 0.3 g de  $\text{MnCl}_2$ , luego se agita levemente (Waldi, 1965).

#### **Revelador común para todo tipo de metabolito**

##### **2) Ácido sulfúrico al 30 %**

En un matraz de 250 mL se agrega lentamente 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , luego se agrega 50 mL de alcohol absoluto (Waldi, 1965).